

双歧杆菌粘附素对脂多糖和 H₂O₂ 调节肠上皮细胞增殖和凋亡的影响

钟世顺, 张振书, 王继德, 赖卓胜, 潘令嘉 (第一军医大学南方医院全军消化内科研究所, 广东 广州 510515)

摘要:目的 研究双歧杆菌分泌型粘附素对脂多糖(LPS)和 H₂O₂ 体外调节肠上皮细胞增殖和凋亡的影响。方法 用 ³H-TdR 掺入法、流式细胞仪和荧光染色等方法观察肠上皮细胞增殖和凋亡的情况。结果 100 μg/L LPS 对细胞增殖和凋亡均有促进作用, 200 μmol/L H₂O₂ 可抑制肠上皮细胞增殖, 促进凋亡。丫啶橙荧光染色见细胞核染色质致密浓染或裂解成碎片。预先经双歧杆菌分泌型粘附素处理后, LPS 组细胞增殖和凋亡率均显著下降, H₂O₂ 组细胞凋亡明显减少。结论 在体外, 双歧杆菌分泌型粘附素能抑制 LPS 和 H₂O₂ 对肠上皮细胞的损害作用, 维持肠上皮细胞增殖与凋亡的平衡。

关键词: 双歧杆菌; 粘附素; 脂多糖; 过氧化氢; 上皮细胞 / 代谢; 细胞增殖 / 药物作用; 细胞凋亡 / 药物作用

中图分类号: R378.2 文献标识码: A 文章编号: 1000-2588(2004)03-0264-05

Effect of *Bifidobacterial* adhesin on lipopolysaccharide- and H₂O₂-induced proliferation and apoptosis of intestinal epithelial cells *in vitro*

ZHONG Shi-shun, ZHANG Zhen-shu, WANG Ji-de, LAI Zhuo-sheng, PAN Ling-jia

Institute for Digestive Diseases of PLA, Nanfang Hospital, First Military Medical University, Guangzhou 510515, China

Abstract: Objective To study the effect of *Bifidobacterial* adhesin on proliferation and apoptosis of intestinal epithelial cell induced by lipopolysaccharide (LPS) and H₂O₂ *in vitro*. **Methods** With ³H-TdR incorporation method, flow cytometry and fluorochrome staining, the proliferation and apoptosis of intestinal epithelial cells induced by LPS and H₂O₂ *in vitro* were studied. **Results** LPS at the dose of 100 μg/L effectively stimulated the proliferation and apoptosis of cells, whereas H₂O₂ at the dose of 200 μmol/L obviously restrained the proliferative ability while enhanced the apoptosis of the cells. Fluorochrome staining showed cell shrinkage, nuclear condensation and fragmentation under microscope. After treatment with *Bifidobacterial* adhesin, the cell proliferation and apoptosis decreased significantly in LPS group, and in H₂O₂ group, cell apoptosis was significantly decreased. **Conclusions** *Bifidobacterial* adhesin can protect intestinal epithelial cells from the damage by LPS and H₂O₂, and maintain the balance between the proliferation and apoptosis of the cells.

Key words: *Bifidobacterial*; adhesin; liposaccharide; hydrogen peroxide; epithelial cell metabolism; cell proliferation/drug effects; cell apoptosis/drug effects

双歧杆菌是人体肠道中最重要的生理菌, 对维持肠道的微生态平衡和机体的健康具有重要意义。我们研究小组于 1997 年首次从双歧杆菌耗尽培养上清液中纯化出一种相对分子质量为 16 000 的蛋白质, 能介导双歧杆菌并阻断致病性大肠杆菌(EPEC)和产毒性大肠杆菌(ETEC)对肠上皮细胞的粘附^[1-3]。日本学者 Fujiwara 等^[4]也于 1999 年从双歧杆菌培养上清中分离出一种相对分子质量为 52 000 的蛋白质。以上提示双歧杆菌存在分泌型的粘附素成分, 但该成分对肠上皮细胞生物学活性的影响如何, 尚不清楚。本研究通过 ³H-TdR 掺入法、流式细胞仪和荧光染色等方法, 观察体外双歧杆菌分泌型粘附素在 LPS 和 H₂O₂ 调节肠上皮 Lovo 细胞增殖和凋亡中的作用。

1 材料和方法

1.1 材料

收稿日期: 2003-12-07

基金项目: 广东省自然科学基金资助(010621)

Supported by Natural Science Foundation of Guangdong Province(010621)

作者简介: 钟世顺(1969-), 男, 第一军医大学在读博士研究生, 主治医师, 电话: 020-61641544, E-mail: zss@fimmu.com

青春型双歧杆菌 1027 株 (*Bifidobacterium adolescentis* 1027, B. ado 1027) 由本所分离、保存, 经 API-20A 及 TAB 系统(英国)和多次生化鉴定为青春型双歧杆菌。肠上皮细胞株 Lovo 引自本校病理教研室, 置于 RPMI 1640 中, 37 °C、5% CO₂ 孵箱内培养, 取对数生长期细胞实验。³H-TdR 购于中国科学院上海核技术开发公司。凋亡检测试剂盒 Annexin V-FITC 为 Biovision 产品。LPS: *E.coli*.O111:B4(Sigma 公司)。

1.2 方法

1.2.1 双歧杆菌分泌型粘附素的提取及纯化 按郑跃杰等^[1]报道的方法, 将细菌接种于硫乙醇酸盐液体培养基, 置厌氧培养箱 37 °C 培养 48 h 离心收集培养上清, 经饱和硫酸铵沉淀, Superdex75 柱凝胶过滤, Q-Sepharose FF 离子交换层析后, 收集第一峰, 其相对分子质量为 16 000, 冻干保存。

1.2.2 ³H-TdR 掺入法测定细胞增殖 实验分为 7 组: 对照组; LPS(100 μg/L) 或 H₂O₂(200 μmol/L) 单独处理组; 不同浓度粘附素(1、5、10、20、30 μg/ml)+(LPS 或 H₂O₂) 组。取对数生长期细胞, 用含 5% 胎牛血清的 RPMI 1640 配成 1×10⁴/ml 细胞悬液, 接种于 96 孔培

养板中,每孔 0.1 ml,每组设 6 个复孔。培养 3 h 后加待测标本,37 °C 培养 12 h 后每孔加入 1 μCi ³H-TdR,继续培养 4 h 后终止反应。用细胞收获器将细胞移至玻璃纤维滤纸上晾干,将待测滤纸片置于闪烁杯中,加入 2 ml 闪烁液,用液闪仪(Beckman LS6500)测定放射性核素每分钟闪烁计数(DPM)值。

1.2.3 流式细胞仪检测细胞凋亡 实验分组同上。取不同处理组细胞,按试剂盒说明书分别加入 1×Binding Buffer 500 μl,Annexin V-FITC 5 μl 和 PI 5 μl,避光室温孵育 5 min。流式细胞仪(FACS-420,USA)在激发波长 488 nm 条件下检测,每次计数 5 000 个细胞。

1.2.4 丫啶橙染色 根据《分子生物学常用实验方法》^[5]进行染色。滴加经或未经 LPS 和 H₂O₂(12 h)处理的细胞悬液于载玻片上,成单细胞层。甲醇固定 5 min,丫啶橙染色,荧光显微镜下观察。同时在光镜下观察细胞形态学变化。

1.3 统计学处理

所得数据用 SPSS10.0 统计软件包进行处理,多个样本均数的比较采用方差分析,多个实验组与一个对照组的两两比较用最小显著差法(the least significant difference, LSD)分析,二组间比较采用 t 检验,以 P<0.05 为有统计学意义。

2 结果

2.1 ³H-TdR 掺入法测定细胞增殖

³H-TdR 掺入实验表明,100 μg/L LPS 能显著促进肠上皮细胞的增殖,而双歧杆菌分泌型粘附素则能抑制 LPS 对肠上皮细胞的促增殖作用,且随粘附素浓度的升高,抑制作用有逐渐增强的趋势(表 1)。而 200 μmol/L H₂O₂ 对肠上皮细胞有明显的抑制增殖作用,双歧杆菌分泌型粘附素可对抗 H₂O₂ 的这种抑制增殖作用(表 2)。

2.2 流式细胞仪检测细胞凋亡(图 1)

对照组细胞凋亡率为(4.40±0.52)%,LPS 处理组

表 1 双歧杆菌粘附素对 LPS 体外诱导肠上皮细胞增殖的影响 (x̄±s)

Tab.1 Effects of Bifidobacterial adhesin on intestinal epithelial cell proliferation induced by LPS in vitro (Mean±SD)

Group	DPM
Control	31 459.74±2 398.40
LPS(100 μg/L)	57 309.75±9 376.96*
LPS(100 μg/L) +adhesion(1 μg/ml)	51 754.95±6 819.52 [#]
LPS(100 μg/L) +adhesion(5 μg/ml)	44 013.64±3 647.42 ^{##}
LPS(100 μg/L) +adhesion(10 μg/ml)	40 010.88±2 048.16 ^{###}
LPS(100 μg/L) +adhesion(20 μg/ml)	35 017.16±2 054.71 ^{###}
LPS(100 μg/L) +adhesion(30 μg/ml)	31 872.79±1 340.57 ^{###}

DPM: Disintegration per minute; *P<0.01 vs control group;

[#]P>0.05, [#]P<0.01 vs LPS group

表 2 双歧杆菌粘附素对 H₂O₂ 体外抑制肠上皮细胞增殖的影响 (x̄±s)

Tab.2 Effects of Bifidobacterial adhesin on intestinal epithelial cell proliferation inhibited by H₂O₂ in vitro (Mean±SD)

Group	DPM
Control	31 362.46±2 809.89
H ₂ O ₂ (200 μmol/L)	9 503.53±1 461.95*
H ₂ O ₂ (200 μmol/L) +adhesion(1 μg/ml)	12 395.55±2 012.25 [#]
H ₂ O ₂ (200 μmol/L) +adhesion(5 μg/ml)	17 646.02±1 650.42 ^{##}
H ₂ O ₂ (200 μmol/L) +adhesion(10 μg/ml)	24 277.81±2 659.85 ^{###}
H ₂ O ₂ (200 μmol/L) +adhesion(20 μg/ml)	28 562.22±2 598.55 ^{###}
H ₂ O ₂ (200 μmol/L) +adhesion(30 μg/ml)	32 829.80±2 468.40 ^{###}

*P<0.01 vs control group; [#]P<0.05, ^{##}P<0.01 vs H₂O₂ group

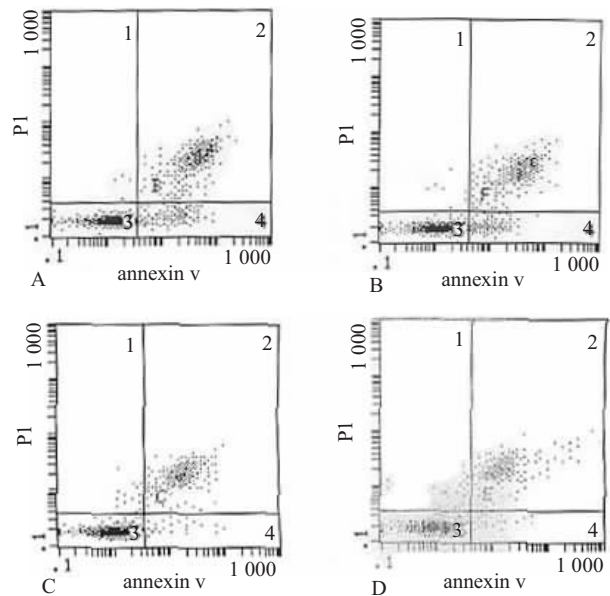


图 1 流式细胞仪检测细胞凋亡

Fig.1 Apoptosis of cells detected by flow cytometry

Panels C and D display significantly decreased cell apoptosis (4 regions) in comparison with panels A and B.

A: LPS group; B: H₂O group; C: LPS and adhesin group; D: H₂O₂ and adhesin group

细胞凋亡率为(14.63±0.57)%,加入双歧杆菌分泌型粘附素后,细胞凋亡率逐渐下降,随着粘附素浓度的逐渐升高,这种作用愈益明显(P<0.01,表 3)。而 H₂O₂ 处理组,其细胞凋亡更为明显,凋亡率达(23.28±0.68)%,双歧杆菌分泌型粘附素处理后,细胞凋亡率也逐渐下降,而且随着粘附素浓度的逐渐升高,这种抑制作用也更为明显(P<0.01,表 4)。

2.3 丫啶橙染色和光镜下观察细胞形态学变化

在荧光显微镜下,LPS 处理组既可见细胞核处于分裂状态的增殖细胞,又可见凋亡细胞,其染色质呈浓染的块状或颗粒状荧光,聚集于核周边或裂解成碎片;而先经粘附素处理后,增殖和凋亡细胞均明显减少。而 H₂O₂ 处理组可见更多凋亡细胞,增殖细胞数量则较少;先经粘附素处理后,凋亡细胞数明显减少。见图

表 3 双歧杆菌分泌型粘附素对 LPS 体外诱导肠上皮细胞凋亡的影响($\bar{x}\pm s$)

Tab.3 Effect of purified adhesin of *B. ado* 1027 on apoptosis of intestinal epithelial cell induced by LPS *in vitro* (Mean±SD)

Group	Rate of apoptosis (%)
Control	4.40±0.52
LPS(100 μg /L)	14.63±0.57*
LPS(100 μg /L) +adhesin(1 μg/ml)	11.93±1.19 [#]
LPS(100 μg /L) +adhesin(5 μg/ml)	9.2±0.79 ^{##}
LPS(100 μg /L) +adhesin(10 μg/ml)	7.40±0.85 ^{###}
LPS(100 μg /L) +adhesin(20 μg/ml)	5.38±0.60 ^{###}
LPS(100 μg /L) +adhesin(30 μg/ml)	5.48±0.83 ^{###}

* $P<0.01$ vs control; [#] $P>0.05$, ^{##} $P<0.01$ vs LPS group; B. ado: Bifidobaclerium adolescentis

表 4 双歧杆菌分泌型粘附素对 H₂O₂ 体外诱导肠上皮细胞凋亡的影响($\bar{x}\pm s$)

Tab.4 Effect of purified adhesin of *B. ado* 1027 on intestinal epithelial cell apoptosis induced by H₂O₂ *in vitro* (Mean±SD)

Group	Rate of apoptosis (%)
Control	4.40±0.52
H ₂ O ₂ 100 μg /L	23.28±0.68*
H ₂ O ₂ 100 μg /L +adhesin 1 μg/ml	21.13±1.3 [#]
H ₂ O ₂ 100 μg /L +adhesin 5 μg/ml	14.83±0.80 ^{##}
H ₂ O ₂ 100 μg /L +adhesin 10 μg/ml	7.63±0.62 ^{###}
H ₂ O ₂ 100 μg /L +adhesin 20 μg/ml	6.18±0.71 ^{###}
H ₂ O ₂ 100 μg /L +adhesin 30 μg/ml	4.75±0.62 ^{###}

* $P<0.01$ vs control; [#] $P<0.05$, ^{##} $P<0.01$ vs H₂O₂

2~5。光镜下观察见单独 LPS 或 H₂O₂ 处理组细胞变小、变圆,胞质颗粒增多,部分细胞脱落漂浮于培养基中;

先经粘附素处理后,细胞形态生长良好,多表现为梭形。

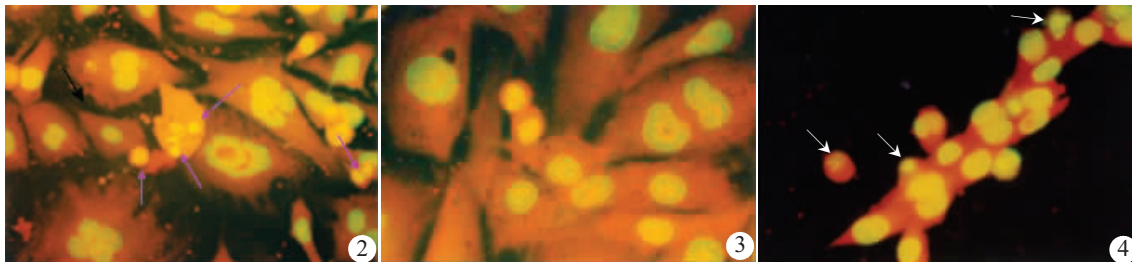


图 2 LPS 处理后的细胞荧光染色(原放大倍数:×400)

Fig.2 Fluorochrome staining of the cells treated with LPS, showing cell shrinkage and nuclear condensation (Original magnification: ×400)

图 3 LPS+ 粘附素处理后的细胞荧光染色(原放大倍数:×400)

Fig.3 Fluorochrome staining of cells treated with LPS and adhesin, showing homogenous density of the cell nuclei (Original magnification: ×400)

图 4 H₂O₂ 处理后的细胞荧光染色(原放大倍数:×400) 细胞核浓缩、碎裂

Fig.4 Fluorochrome staining of H₂O₂-treated cells (Original magnification: ×400)

Nuclear condensation and formation of fragment are shown.

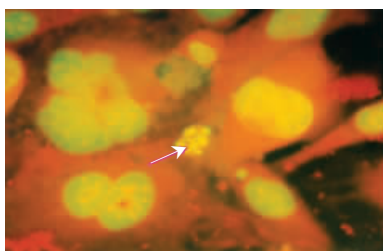


图 5 H₂O₂+ 粘附素处理后的细胞荧光染色(原放大倍数:×400)

Fig.5 Fluorochrome staining of H₂O₂- and adhesin-treated cells, showing significant decrease of apoptotic cells (Original magnification: ×400)

3 讨论

粘附素是通常存在于细菌表面或分泌至细胞外的粘附活性分子,不但可以介导母菌对靶细胞的粘着,激发粘附的细胞内信号传导途径;并且通过竞争抑制等机制阻断具有类似受体结构的细菌的粘附活性。肠粘膜屏障受损可引起细菌和内毒素易位^[6,7],诱

发内毒素休克、全身败血症或远端感染,加重病情,增加死亡率。双歧杆菌在维持机体肠粘膜屏障的完整性方面起重要作用^[8],但应用其耗尽培养上清液中成分调节肠上皮细胞生物学功能,尚未见报道。我们应用我室从青春型双歧杆菌 1027 株耗尽培养上清液中纯化出的一种相对分子质量为 16 000 的蛋白质,体外观察了双歧杆菌分泌型粘附素对 LPS 和 H₂O₂ 调节肠上皮 Lovo 细胞增殖和凋亡的影响。

在多细胞生物中内环境的稳定是由细胞增殖和细胞凋亡的平衡来维持的。流式细胞仪是检测细胞凋亡十分准确和可靠的手段之一。由于早期细胞凋亡和坏死时细胞内磷脂改变,磷脂酰丝氨酸(PS)从内部转移到细胞膜表面,所以用 FITC 标记 Annexin-V 染色能够较检测细胞核改变如 DNA 碎片更早地辨别凋亡细胞。凋亡和坏死的主要区别是当细胞发生凋亡时,细胞膜仍保持完整,而坏死时,细胞膜破裂。因此,借助细胞膜对 PI 通透性的差异可以区分细胞凋亡与坏死。我们通过 Annexin-V 和 PI 双染色检

测早期细胞凋亡。

LPS是革兰氏阴性菌细胞壁的主要成分之一,由特异性多糖、核心多糖和脂类A组成。当来自于肠道的和感染部位的内毒素大量进入体内引起炎症介质的合成、释放,最终发生脓毒血症。脓毒血症时肠上皮细胞增生增多,未成熟上皮细胞的比例增高,肠细胞坏死及程序性死亡均增多。LPS还可增加机体NO的产生,而NO可诱导TNF- α 等细胞因子的产生,继而通过细胞因子介导组织损伤,引起严重的炎症反应,导致肠粘膜屏障功能不全。Olaya等^[9,10]研究发现LPS能促进肠上皮细胞IEC-6和LS-123的DNA合成,脂类A至少部分参与了LPS的细胞丝裂原作用。我们的研究也表明,100 $\mu\text{g/L}$ 的LPS作用于肠上皮细胞时,细胞增殖增加,凋亡也增加。尽管细胞增殖可能是维持组织完整性的重要的生理反应,但由于NO、TNF- α 等细胞因子以及细胞凋亡的逐渐增加,肠粘膜屏障的完整性将逐渐受到破坏,肠道细菌、内毒素易位,导致肠屏障功能不全乃至衰竭。而双歧杆菌纯化粘附素能抑制LPS对肠上皮细胞的这种促增殖、促凋亡作用,显微镜下观察可见细胞形态保持良好。提示纯化粘附素可能与LPS竞争肠上皮细胞上的结合位点,使细胞形态保持完整,从而维持肠上皮细胞增殖与凋亡间的生理平衡和肠粘膜屏障的完整性。

过氧化物自由基对细胞的作用存在一个剂量效应和时间效应关系,高剂量有直接杀伤作用,中剂量可引发凋亡,低剂量具有细胞丝裂原的作用,可刺激细胞增殖^[11]。在各种体外实验模型中,如双氧水或超氧根离子等氧化剂能提高肠上皮细胞通透性,并能通过促进过多的肌动蛋白聚合作用来破坏细胞骨架,而细胞骨架是肠粘膜保持完整性的关键组成部分^[12]。反应性氧代谢产物能引起ATP耗竭^[13],也是引起肠屏障功能不全的一个重要因素。有研究表明^[14],活性氧可以通过刺激线粒体释放细胞色素C引起Caspases类的活化,从而触发细胞凋亡发生的级联反应。目前认为,活性氧可能是细胞凋亡发生过程中普遍存在的中间介质^[15]。本研究采用200 $\mu\text{mol/L}$ 的H₂O₂作用于肠上皮Lovo细胞,发现具有明显的抑制细胞增殖和促进细胞凋亡的作用。肠上皮细胞增殖受到抑制,凋亡增加将使肠粘膜细胞的数量不断减少,肠通透性增强,最终使肠粘膜屏障功能遭到破坏。而预先经双歧杆菌纯化粘附素处理后,H₂O₂的这两种作用均明显减弱。但其作用机制还不十分清楚,有待进一步研究。

总之,本研究表明,在体外,双歧杆菌分泌型粘附素能抑制LPS和H₂O₂对肠上皮细胞的损害作用,有效地维持肠粘膜上皮细胞增殖与凋亡的平衡,从而保持肠粘膜屏障功能的完整性。这也为肠粘膜屏障功能障碍的临床防治提供了一条新的思路。

参考文献:

- [1] 郑跃杰,潘令嘉,王立生,等.双歧杆菌粘附素的提纯[J].中华微生物学和免疫学杂志,1999,19(3):196.
Zheng YJ, Pan LJ, Wang LS, et al. Purified of *Bifidobacterium ad-hesin*[J]. Chin J Microbiol Immunol, 1999, 19(3): 196.
- [2] 郑跃杰,潘令嘉,叶桂安,等.双歧杆菌对EPEC和ETEC粘附的竞争抑制作用[J].中国微生态学杂志,1999,11(6):329-31.
Zheng YJ, Pan LJ, Ye GA, et al. Competitive inhibition of adherence of EPEC and ETEC to intestinal epithelial cells by human *Bifidobacterium* strains[J]. Chin J Microecol, 1999, 11(6): 329-31.
- [3] 郑跃杰,潘令嘉,叶桂安,等.双歧杆菌对肠上皮细胞粘附的研究[J].中华微生物和免疫学杂志,1997,17(2):85-7.
Zheng YJ, Pan LJ, Ye GA, et al. Study on the adherence of human *Bifidobacteria* to cultured human intestinal epithelial cells[J]. Chin J Microbiol Immunol, 1997, 17(2): 85-87.
- [4] Fujiwara S, Hashiba H, Hirota T, et al. Purification and characterization of a novel protein produced by *bifidobacterium longum* SBT2928 that inhibits the binding of enterotoxigenic *Escherichia coli* Pb176(CFA/II) to ganglioside GM2[J]. J Appl Microbiol, 1999, 86(4): 615-21.
- [5] 姜泊,张亚历,周殿元,主编.分子生物学常用实验方法[M].北京:人民军医出版社,1996.174.
- [6] 吴承堂,黎沾良,熊德鑫.急性坏死性胰腺炎肠通透性及病理改变实验观察[J].第一军医大学学报,1999,19(1):28-30.
Wu CT, Li ZL, Xiong DX. Changes of intestinal permeability and histologies of intestinal mucosa in acute necrotizing pancreatitis in dogs[J]. J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 1999, 19(1): 28-30.
- [7] 吴承堂,黎沾良,黄祥成,等.急性坏死性胰腺炎早期肠源性感染的实验研究[J].第一军医大学学报,1999,19(2):104-7.
Wu CT, Li ZL, Huang XC, et al. An experimental study on the pathogenesis of enteric infection complicating impairment of the gut barrier function in acute necrotizing pancreatitis[J]. J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 1999, 19(2): 104-7.
- [8] 吴承堂,黄祥成,齐德林,等.急性坏死性胰腺炎早期内毒素血症及其防治[J].第一军医大学学报,1999,19(5):402-4.
Wu CT, Huang XC, Qi DL, et al. An experimental study on pathogenesis of early endotoxemia in acute necrotizing pancreatitis[J]. J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 1999, 19(5): 402-4.
- [9] Olaya J, Neopikhanov V, Uribe A. Lipopolysaccharide of *Escherichia coli*, polyamines and acetic acid stimulate cell proliferation in intestinal epithelial cells *In Vitro*[J]. Cell Dev Biol-Animal, 1999, 34(1): 43-8.
- [10] Olaya J, Neopikhanov V, Soderman C, et al. Bacterial wall components such as lipoteichoic acid, peptidoglycan, liposaccharide and lipid A stimulate cell proliferation in intestinal epithelial cells [J]. Microb Ecol Health Dis, 2001, 13(2): 124-8.
- [11] 杨瑞华,海春旭,李瑞珍,等.过氧化氢与细胞生长状态的剂量反应关系研究[J].癌变·畸变·突变,1997,9(2):92-9.
Yang RH, Hai CX, Li RZ, et al. Dose-response relationship between cell proliferation and hydrogen peroxide[J]. Carcinog Teratog Mutagen, 1997, 9(2): 92-9.
- [12] Banan A, Fitzpatrick L, Zhang Y, et al. OPC-compounds prevent oxidant-induced carbonylation and depolymerization of the F-actin cytoskeleton and intestinal barrier hyperpermeability [J]. Free Radic

Biol Med, 2001, 30(3): 287-98.

[13] Kumar S, Bharti A, Mishra NC, *et al.* Targeting of the c-Abl tyrosine kinase to mitochondria in the necrotic cell death response to oxidative stress[J]. J Biol Chem, 2001, 276(20): 17281-5.

[14] Green DR, Reed JC. Mitochondria and apoptosis[J]. Science, 1998,

281(28): 1309-12.

[15] Lin HL, Lin TY, Wu CW, *et al.* 2-Methoxyestradiol-induced caspase-3 activation and apoptosis occurs through G₂/M arrest dependent and independent pathways in gastric carcinoma cells[J]. Cancer, 2001, 92(3): 500-9.

光动力治疗肛周湿疹样癌 1 例报告

Photodynamic therapy for Paget's disease: report of one case

李黎波, 罗荣城, 廖旺军, 张鸣江, 周瑾, 刘晓军, 缪景霞(第一军医大学南方医院肿瘤光动力治疗中心, 广东广州 510515)

关键词: 肛门肿瘤; 佩吉特病; 光化学疗法

中图分类号: R543; R735.38 文献标识码: B 文章编号: 1000-2588(2004)03-0268-01

湿疹样癌的临床治疗手段主要是手术切除, 并大面积植皮, 尤其是侵及肛门、肛管的湿疹样癌, 需要手术后行人造肛门。我院收治肛周湿疹样癌 1 例, 经光动力治疗治愈, 现报告如下。

1 临床资料

患者男, 56 岁, 9 年前在肛门周围出现一小片斑丘疹, 颜色发红, 轻度瘙痒, 于当地医院就医, 考虑为“肛周湿疹”, 予“皮炎平”等药物治疗, 效果欠佳。肛周皮肤经长期抓挠后皮疹逐渐加重成大片状, 皮疹加厚、变硬, 并间有液性分泌物渗出, 瘙痒明显。2002 年 9 月患者于某医院就医, 经肛周组织病理检查确诊为“Paget 病”, 肠镜检查报告为“直肠内有多处病变”。患者先后辗转广州市 3 家大医院, 所有接触过的专家或教授都认为必须行外科手术, 且手术范围较大, 不但需要大面积植皮而且肛门无法保留, 只有采用人工肛门。患者为进一步诊治于 2002 年 10 月 9 日到南方医院皮肤科住院检查, 再次行肛周皮肤病变处活检, 病理报告符合“Paget 病”。经检查患者的肿瘤病变已经侵犯至肛门, 该病目前主要的治疗手段是手术切除肿瘤, 其切除范围应当包括肿瘤病变区域及周围部分正常皮肤。由于手术涉及的科室较多, 患者先后到过皮肤科、整形科、普外科。手术前 1 天, 患者听说南方医院肿瘤中心有肿瘤光动力治疗, 治疗肿瘤既不用手术, 也不用植皮, 更可以保留肛门, 立即决定转到肿瘤科治疗。2002 年 11 月 12 日光动力治疗中心为患者进行光动力治疗: 先给患者静脉注射光敏剂(美国 FDA 认证的 PHOTOFRIN), 剂量 2 mg/kg·b.w., 光敏剂被肿瘤组织摄取形成高浓度, 48 h 后用 630 nm 红色激光(激光治疗机为美国 FDA 认证的 DIOMED)照射肿瘤部位。肛周皮肤用微透镜光斑光纤进行照射, 肛门内的肿瘤则通过肠镜用柱状光导纤维进行照射。肿瘤组织内的光敏剂被激光激活, 从而在肿瘤组织内产生单线态氧和血栓素 A₂, 从而达到破坏肿瘤细胞而杀灭肿瘤。治疗后 2 个月内患者肿瘤部位的皮肤逐渐为正常皮肤所取代, 4 个月后肿瘤组织完全消失, 正常皮肤完全修复肿瘤部位。患者既保住了肛门, 可以正常解大便, 又保

住了肛周皮肤, 达到了消灭肿瘤、保护器官功能和美容的效果。

2 讨论

光动力疗法与手术、化疗、放疗等常规肿瘤治疗手段相比, 具有许多优点: (1) 创伤小; (2) 毒性小; (3) 选择性好; (4) 适用性好; (5) 重复性好; (6) 可姑息治疗; (7) 可消灭隐性癌病灶; (8) 可保护容貌及重要器官功能^[1]。光动力疗法本身几无毒性, 其主要缺点是可发生皮肤光过敏。光动力疗法与其他治疗手段联合可以提高疗效。对某些肿瘤, 先行外科切除, 再施以光动力疗法, 以进一步消灭残留的癌细胞, 减少复发机会; 对另一些肿瘤, 则先行光动力疗法, 使肿瘤缩小后再切除或放疗, 可提高治疗的成功率, 延长患者生存期。对于皮肤恶性肿瘤, 光动力疗法可以使患者既解除癌痛的痛苦, 又可以保留器官功能, 从而达到保护容貌和美容的功效^[2]。

本例肛周湿疹样癌患者病变范围较广, 传统手术方法是在距病灶外缘 2 cm 的正常皮肤处切除病灶, 复发率高^[3]。同时大面积植皮和人造肛门的留置对患者来说无疑是难以接受的, 既使患者手术切除肿瘤后肛周皮肤植皮成功, 留置人造肛门后患者的生存质量也会受到很大影响。光动力治疗后 48 h 可见肿瘤和正常组织分界清楚: 正常组织只是皮肤发红成充血表现, 而癌组织则变性坏死并大量渗出; 1 个月后肿瘤组织脱落, 2 个月后病变部位被正常皮肤组织修复。光动力治疗不但彻底清除了肿瘤, 而且使肛周肿瘤病变处的皮肤得以保留, 同时患者的肛门也保留完好。光动力治疗时我们担心患者有肛门括约肌受影响而导致大便失禁的可能, 但是半年后检查结果显示, 患者肛门排便功能完好。因此光动力治疗是皮肤癌尤其是肛周湿疹样癌治疗的最佳适应证。

参考文献:

- [1] Ceburkov O, Gollnick H. Photodynamic therapy in dermatology[J]. Eur J Dermatol, 2000, 10(7): 568-76.
- [2] Fritsl C, Goerz G, Ruzicka T. Photodynamic therapy progress in dermatology[J]. Arch Dermatol, 2001, 137(4): 663-77.
- [3] 谭仲恺, 鲁开化. 乳房外 Paget 病 4 例的治疗经验[J]. 中华皮肤科杂志 (Chin J Dermatol), 1990, 23(2): 122-3.

收稿日期: 2003-08-11

作者简介: 李黎波(1964-), 男, 第一军医大学在读博士研究生, 主要从事恶性肿瘤综合治疗, 电话: 020-61641657

(责任编辑: 黄开颜)